

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成11年度博士課程 進学

氏 名 金山敦宏

指導教官名 清水 誠

論文題目 NF κ B 活性化に対するタウリンの阻害作用に関する研究

1. 序論

タウリン (2-aminoethanesulfonic acid) は、ヒトをはじめとする動物の多くの組織において、最も多量に存在する遊離型のアミノ酸の一つである。タウリンが炎症を抑制するという報告は数多くされてきた。ハムスターやラットで NO₂ などによって誘導される肺炎がタウリンの経口投与で抑制される。タウリンを経口摂取したマウスでは、傷口のマスト細胞とヒスタミン量が抑制される。このような抗炎症効果は現象としては見い出されたが、どのようにしてタウリンが効果を発揮するかは不明であった。しかしこれらの現象から、タウリンは免疫系細胞の働きに何らかの重要な影響を及ぼすと筆者は推測した。

タウリンは、好中球に多く存在することが報告されている。この細胞に特徴的な点は、貪食能を持ち myeloperoxidase (MPO) を発現することである。好中球は細菌を取り囲むように変形し、貪食空胞を構築してその内に菌を捕らえる。続いて NADPH オキシダーゼが活性化され、過酸化水素が貪食空胞内で生成される。顆粒球から貪食空胞内に放出される MPO を触媒とし、塩素イオンと過酸化水素から次亜塩素酸が貪食空胞内で生成される (H₂O₂-MPO-Cl⁻ system)。次亜塩素酸は強力な酸化剤であり、細菌を死滅させる。しかし、次亜塩素酸が過剰に発生し細胞質内や核内に浸潤すると、宿主細胞のタンパク質や DNA を損傷する。タウリンは次亜塩素酸との反応性が高く、細胞質に入ってきた次亜塩素酸と反応して taurine chloramine (TauCl) になることが知られてい

る。TauCl はクロラミンの中では例外的に安定で最も毒性が低く、タウリンは好中球内の酸化剤スカベンジャーであると言われている。しかし、この事実から動物における抗炎症作用を完全に説明することは難しい。筆者は、TauCl 自身にも抗炎症作用があると推察した。

Nuclear factor κ B (NF κ B) は、炎症において極めて重要な転写因子である。それは、NF κ B の標的遺伝子として炎症に関わる遺伝子が多数知られているからである。NF κ B は Inhibitory protein of κ B (I κ B) と複合体を形成して細胞質に存在している。しかし、TNF α などの刺激で I κ B キナーゼ (IKK) が活性化され、I κ B α の Ser 32/36 がリン酸化されると、ユビキチン-プロテアソーム分解系が働いて I κ B α は分解され NF κ B から解離する。その結果 NF κ B は核内に移行できるようになり、NF κ B binding site に結合し標的遺伝子の転写が誘導される。筆者は NF κ B 活性化プロセスの要である I κ B α の分解に対する TauCl の効果を検討した。

2. TauCl による I κ B α 分解阻害と NF κ B 活性化阻害

Jurkat 細胞を tumor necrosis factor α (TNF α) で刺激すると I κ B α は分解したが、TauCl を前処理すると、I κ B α のバンドのシフトがウエスタンブロットで観察された。そのバンドは TNF α 刺激後も消滅せずに残った。しかも、プロテアソームの阻害剤 (PSI) やリン酸化阻害剤 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) で処理した場合とは異なったバンドのパターンを示した。同時に、核内に移行する NF κ B の経時的増加が TauCl で細胞を前処理すると阻害されることがゲルシフトアッセイにより観察された。ルシフェラーゼのレポーターアッセイでは、細胞を前処理する TauCl の濃度に依存して、TNF α に誘導される NF κ B に依存した転写活性化が抑制された。

3. HL-60 細胞と好中球におけるタウリンの機能

MPO を発現している前骨髄球細胞 HL-60 を過酸化水素で処理すると、Jurkat 細胞を TauCl で処理した場合と同様の I κ B α のシフトバンドが観察され、TNF α による NF κ B の核移行は阻害された。MPO の阻害剤である 4-aminobenzoic hydrazide (ABAH) で前処理すると、I κ B α のバンドはシフトせずに TNF α 処理によって分解し、しかも NF κ B の核移行は阻害されなかった。以上から、H₂O₂-MPO-Cl system により TauCl が細胞内で生合成され、それが NF κ B の活性化を阻害する可能性が示唆された。細菌貪食によって開始される IL-8 の産生は、タウリン濃度を減少させたラットの好中球では経時的に上昇したが、タウリンを再び吸収させた細胞では、劇的に抑制された。しかも ABAH でこの細胞を前処理すると、IL-8 の産生は上昇した。よって、貪食刺激によって細胞内で合成された TauCl が NF κ B に依存した IL-8 の産生を抑制することが示唆された。

4. TauCl による I κ B α の修飾反応

HL-60 細胞を過酸化水素で処理しても Jurkat 細胞を TauCl で処理した場合と同様に I κ B α

のシフトが観察されたことは、バンドのシフトがタウリンの炎症抑制効果のメカニズムを知る上で大変重要な指標であることを示唆している。そこで、このバンドのシフトの解析を試みた。TauCl 処理による $I\kappa B\alpha$ のバンドのシフトは、 $TNF\alpha$ に誘導される $I\kappa B\alpha$ のバンドのシフトと類似していたため、TauCl が $I\kappa B\alpha$ をリン酸化修飾をする可能性を検討した。FLAG- $I\kappa B\alpha$ (S32/36A) を Jurkat 細胞に過剰発現させ TauCl で処理すると、FLAG- $I\kappa B\alpha$ (S32/36A) のバンドはシフトした。また、Jurkat 細胞を TauCl で処理した後、細胞抽出液をアルカリフォスファターゼで処理しても、シフトしたバンドは元の位置に戻らなかった。Jurkat 細胞の細胞質抽出液を煮沸した後 TauCl で処理しても、 $I\kappa B\alpha$ のバンドは TauCl の濃度に依存してシフトした。以上の一連の実験から、TauCl による $I\kappa B\alpha$ の修飾はリン酸化反応では無く、しかも酵素反応を介さないことが示唆された。

TauCl による $I\kappa B\alpha$ のシフトバンドの形成は、TauCl が $I\kappa B\alpha$ 分子を直接的な化学反応で修飾しているためと推測された。そこでまず $I\kappa B\alpha$ を免沈し、TauCl で処理しウエスタンブロットを行ったところ、 $I\kappa B\alpha$ のバンドはシフトした。次に、Tau³⁶Cl および [¹⁴C]TauCl を合成し、それぞれコンピナントの $I\kappa B\alpha$ とインキュベートした。これを SDS-PAGE で分画しイメージング解析を行うと、TauCl の塩素が $I\kappa B\alpha$ に結合し $I\kappa B\alpha$ が塩素化されることが示唆された。TauCl で処理した $I\kappa B\alpha$ のアミノ酸分析では TauCl 処理でトリプトファンだけが劇的に減少していたので、全てのトリプトファン残基に点突然変異の入った $I\kappa B\alpha$ を HEK293 細胞に発現させ、ウエスタンブロットで観察した。しかし意外にも、変異 $I\kappa B\alpha$ のバンドもコントロールと同様のシフトを示した。以上から、トリプトファン残基の修飾のバンドシフトへの関与は否定された。

5. $I\kappa B\alpha$ のメチオニン残基の酸化反応

筆者は、 $I\kappa B\alpha$ の部分欠失変異体を作成し、 $I\kappa B\alpha$ のバンドのシフトに必要な領域を探索するというアプローチを試みた。まず、 $I\kappa B\alpha$ の 1 番目から 180 番目のアミノ酸を含む欠失変異 $I\kappa B\alpha$ ($I\kappa B\alpha$ (1-180))、および、 $I\kappa B\alpha$ (1-248)、 $I\kappa B\alpha$ (1-289) を合成した。これを TauCl とインキュベートし、電気泳動したが、全ての変異体で野生型の $I\kappa B\alpha$ (1-317) と同様にシフトが観察された。ところが、 $I\kappa B\alpha$ (43-180) はバンドのシフトが生じるのに対し、 $I\kappa B\alpha$ (67-180) はシフトが生じなかった。これを手がかりに TauCl が反応する領域を段階的に狭めた結果、TauCl による $I\kappa B\alpha$ の修飾アミノ酸残基は 45 番目のメチオニン (Met45) であることが示唆された。 $I\kappa B\alpha$ の E43 から Q50 までを含んだペプチド断片 (AceEQMVKELQ) を TauCl で処理し、修飾されたペプチド断片を MS 分析すると、TauCl 処理で $I\kappa B\alpha$ Met45 に相当するメチオニン残基が MetO に酸化されることが明らかとなった。次に、Met45 の変異体を Jurkat 細胞にトランスフェクションし、 $I\kappa B\alpha$ の分解に対する TauCl の影響を観察した。 $I\kappa B\alpha$ M45A (1-280) は TauCl で細胞を前処理してもバンドがほとんどシフトせず、 $TNF\alpha$ の刺激によって分解した。さらに、

pME-I κ B α をトランスフェクションした Jurkat 細胞の場合には、NF κ B に依存したルシフェラーゼの転写活性化が TauCl で 90%抑制されたのに対し、pME-I κ B α M45A では、抑制率が 70%まで低下した。これらの結果から、TauCl が Met45 を酸化し MetO に変換することで、I κ B α が TNF α に誘導される分解に耐性を持つようになり、NF κ B の活性化による転写が抑制されることが強く示唆された。

6. 総括

本研究では、好中球が貪食する時に合成される TauCl が、貪食刺激で活性化されることが知られている NF κ B の活性化を抑制することを示した。そのメカニズムとして、TauCl が I κ B α M45 を酸化することにより I κ B α の分解性を低下させたことを明らかにした。しかし課題も多く残されている。TauCl によって酸化される I κ B α のメチオニンを含めて全て決定し、NF κ B 活性化の阻害に対する個々の関与の程度を検討するとともに、I κ B α M45 の酸化がなぜ分解耐性をもたらすのかを明らかにする必要がある。さらに好中球の細菌貪食の際にこのメカニズムがどの程度関与しているかを検討し、タウリンの抗炎症効果を解明することが望まれる。

